

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/001665

International filing date: 04 February 2005 (04.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-027727  
Filing date: 04 February 2004 (04.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

28.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 4 年    2 月    4 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 4 - 0 2 7 7 2 7  
Application Number:

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

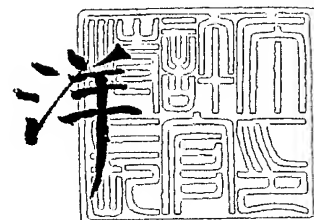
J P 2 0 0 4 - 0 2 7 7 2 7

出      願      人                      三 菱 ウ ェ ル フ ェ ー マ 株 式 有 限 公 司  
Applicant(s):

2 0 0 5 年    4 月    7 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 RK03009  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 9/16  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株  
    株式会社 東京オフィス内  
    【氏名】 浅原 尚美  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株  
    株式会社 東京オフィス内  
    【氏名】 橋本 元範  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株  
    株式会社 東京オフィス内  
    【氏名】 幸 敏志  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000006725  
    【氏名又は名称】 三菱ウェルファーマ株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100082511  
    【氏名又は名称】 高柳 昌生  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 013114  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0114651

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

パラオキシナーゼ (PON)、ポリオールおよび 3-[(3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート (CHAPS) を含む PON 含有製剤。

**【請求項 2】**

ポリオールがグリセロールである請求項 1 の PON 含有製剤。

**【請求項 3】**

PON 含有溶液を、疎水性担体処理し、次いでポリオールおよび CHAPS の存在下に陰イオン交換体処理することを特徴とする PON の精製方法。

**【請求項 4】**

PON にポリオールおよび CHAPS を添加することを特徴とする PON の安定化方法。

**【請求項 5】**

PON を有効成分とする、虚血再灌流に伴う障害および／または脳梗塞の予防治療剤。

**【請求項 6】**

PON、ポリオールおよび CHAPS を含む、虚血再灌流に伴う障害および／または脳梗塞を予防治療するための薬剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】パラオキシナーゼ

【技術分野】

【0001】

本発明はパラオキシナーゼ（以下、PON）に関するものである。詳細にはPONを含有する製剤、精製方法、安定化方法および新規な医薬用途に関する。

【背景技術】

【0002】

パラオキシナーゼ（ヒト血清パラオキシナーゼ、PON1、以下PON）は、 $Ca^{2+}$  依存性の分子量約 45 kDa の糖蛋白質であり、血中で高密度リポ蛋白質（HDL）を構成する蛋白成分の一つとして存在している。PONはオクソン、有機リン、神経ガスのサリンなどの芳香族カルボン酸を加水分解する血清酵素として知られており、これらの解毒剤として使用することができる。近年、PONの生理活性が明らかになりつつあり、例えば、抗動脈硬化作用、抗酸化作用などが報告されている（非特許文献1、同2）。

PONの精製に関しては、ブルーアガロース処理とDEAE型陰イオン交換体処理を組合せる方法が報告されている（非特許文献3、同4）。該報告例によれば、グリセロールとポリオキシエチレン・アルキルフェニルエーテル型の非イオン系界面活性剤（具体的にはEmulgen、Nonidet P-40、共に商品名）の共存下にPONを精製することが報告されているが、それ以外のもの、例えば、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート（CHAPS）等は開示されていない。また、PONを含む血清検体にCHAPSを添加し、該酵素活性を維持することが報告されている（特許文献1）が、これは精製PONに関するものではない。

PONは動脈硬化への適用の可能性（特許文献2）が示唆されている。また、生体中のPON量と狭心症、心筋梗塞、脳梗塞の関係を示唆する報告例がある（特許文献1）。しかしながらPONが動物実験あるいは臨床試験で有用であったとの報告はほとんどと言っていないほどなされていないのが現状である。

このようにPONは医薬として有用であることが示唆されているにすぎず、またPONを医薬品として安定的に供給する手段についてはほとんど報告例がなく、よく知られているわけではない。

【特許文献1】特開2000-333674号公報

【特許文献2】PCT特許公開WO00/30425号パンフレット

【非特許文献1】ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション（J. Clin. Invest.）、1998年、101巻、1581-1590頁

【非特許文献2】ネイチャー（Nature）、1998年、394巻、284-287頁

【非特許文献3】ドラッグ・メタボリズム・アンド・ディスポジション（Drug Metabolism and Disposition）、1991年、19巻1号、100-106頁

【非特許文献4】バイオケミストリ（Biochemistry）、1991年、30巻、10133-10140頁

【非特許文献5】プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミ・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. U S A）、1995年、92巻、7187-7191頁

【非特許文献6】ジャーナル・オブ・リピド・リサーチ（J. Lipid Rese a c h）、2001年、42巻、951-958頁

【非特許文献7】ストローク（Stroke）、1989年、20巻、1037-1043頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

従来の精製法では高純度のPONを効率よく回収することが困難であると予想された。また従来より使用されている界面活性剤、例えば、ポリオキシエチレン・アルキルフェニルエーテル型の非イオン系界面活性剤を用いた場合、PONの安定化効果は必ずしも良好なものではないことが確認された。さらに、これらの界面活性剤のうち、高分子量のものは透析などにより除去できないため、クロマト処理により精製されたPONを動物などに投与するための濃縮操作を行うと、これらの界面活性剤も一緒に濃縮されてしまい、生体への悪影響が懸念された。

本発明の目的は、PONを臨床適用可能とするための精製および製剤化技術を提供することにある。また、本発明の別の目的はPONの新規な医薬用途を提供することにある。

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0004】

本発明者らは上記の事情を考慮に入れて研究を行った結果、PONの精製時および／または保存時に、ポリオールおよびCHAPSを添加することにより、活性発現、活性回収率および保存安定性が改善できることを見出した。

また、本発明者らは、虚血再灌流動物モデルを用いた効力試験においてPONが有用であることを証明することに初めて成功した。

本発明は、1) PON、ポリオールおよびCHAPSを含むPON含有製剤、2) PON含有溶液を、疎水性担体処理し、次いでポリオールおよびCHAPSの存在下に陰イオン交換体処理することを特徴とするPONの精製方法、3) PONにポリオールおよびCHAPSを添加することを特徴とするPONの安定化方法、4) PONを有効成分とする、虚血再灌流に伴う障害および／または脳梗塞の予防治療剤、および5) PON、ポリオールおよびCHAPSを含む、虚血再灌流に伴う障害および／または脳梗塞を予防治療するための薬剤、に関する。

#### 【発明の効果】

##### 【0005】

ポリオールとCHAPSを併用することにより、PONの精製時・保存時の安定性を改善できる。その結果、生体（インビボ）での効力試験が初めて可能となった。すなわち、動物実験で初めてPONが虚血再灌流に伴う障害および／または脳梗塞に有用であることが立証されたのである。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0006】

#### 出発原料

本発明で用いられる出発原料はPON含有溶液であれば特に限定されない。例えば、血液、血漿、血清、血漿からフィブリンを除去したもの、血漿からコーンの低温エタノール分画法により得られる上清画分E f f. Iなどが例示される。また、遺伝子組換え技術を利用して調製されたものであってもよい。具体的には、組換え技術を用いてCHO細胞、昆虫細胞等に発現させた組換えPONを含む溶液（例えば、培養液、培養上清など）を用いることができる（非特許文献5、同6を参照のこと）。

#### 精製

本発明の精製方法は、PON含有溶液を疎水性担体処理し、次いでポリオールおよびCHAPSの存在下に陰イオン交換体処理することを特徴とするものである。

#### 疎水性担体処理

疎水性担体は不溶性担体に疎水性基を結合したものである。不溶性担体としてはアガロース（商品名セファロースなど）、架橋デキストラン（商品名セファデックスなど）、親水性ビニルポリマー（商品名トヨパールなど）等が例示される。また疎水性基としては、アルキル基、好ましくは炭素数4～18のアルキル基（例えば、ブチル基、オクチル基、オクタデシル基など）、またはフェニル基等が例示される。不溶性担体に疎水性基を結合する方法は公知の方法に準じて行うことができる。また市販品を入手することもできる。

疎水性担体処理の方法としては、具体的には、PON含有溶液を疎水性担体に接触させてPONを疎水性担体に吸着させた後に、特定の溶媒を用いてPONを溶出することにより

回収する。吸着条件としては、 $\text{pH}$  6～8 程度、塩濃度は 0.01～0.2 M 程度が挙げられる。また、0.1～2 mM 程度のカルシウム塩を添加してもよい。具体的には、1 mM 塩化カルシウムを含む生理食塩水（0.15 M 塩化ナトリウム）等が例示される。吸着後に洗浄を行う場合は、吸着と同様の条件により行うことができる。

溶出時には、30～70 w/v %、好ましくは 40～60 w/v % 程度の炭素数 1～4 のアルキレングリコール類（例えば、エチレングリコールなど）を用いる。また、0.1～2 mM 程度のカルシウム塩を添加してもよい。具体的には、50 w/v % エチレングリコール、1 mM 塩化カルシウムを含む水溶液などが例示される。

#### 陰イオン交換体処理

陰イオン交換体は不溶性担体に陰イオン交換基を結合したものである。不溶性担体としてはアガロース（商品名セファロースなど）、架橋デキストラン（商品名セファデックスなど）、親水性ビニルポリマー（商品名トヨパールなど）等が例示される。また陰イオン交換基としては、ジエチルアミノエチル基（DEAE 型）、四級アンモニウム基（Q 型）、四級アミノエチル基（QAE 型）等が例示される。好ましくは、四級アンモニウム基、四級アミノエチル基などの強塩基性のものを用いる。不溶性担体に陰イオン交換基を結合する方法は公知の方法に準じて行うことができる。また市販品を入手することもできる。

陰イオン交換体処理はポリオール（例えば、グリセロールなど）および CHAPS（N, N-ジメチル-N-(3-スルホプロピル)-3-[[[(3 $\alpha$ , 5 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ )-3, 7, 12-トリヒドロキシ-24-オキソコラン-24-イル]-アミノ]-1-プロパンアミン、または、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート）の共存下に行う。ポリオールの添加量としては 10～40 w/v %、好ましくは 20～30 w/v % 程度が例示される。CHAPS の添加量としては 0.01～1 w/v % 程度が例示される。なお、本処理以降も精製を行う場合は全て、ポリオールおよび CHAPS の共存下に行う。

陰イオン交換体処理の方法としては、具体的には、PON 含有溶液を陰イオン交換体に接触させて PON を陰イオン交換体に吸着させた後に、高塩濃度の溶媒を用いて PON を溶出することにより回収する。吸着条件としては、 $\text{pH}$  6～9 程度、塩濃度は 0.001～0.1 M 程度が挙げられる。また、0.1～2 mM 程度のカルシウム塩を添加してもよい。具体的には、1 mM 塩化カルシウム、25 w/v % グリセロール、0.5 w/v % CHAPS を含む 25 mM トリス-塩酸緩衝液（ $\text{pH}$  7.5）等が例示される。吸着後に洗浄を行う場合は、吸着と同様の条件により行うことができる。さらに溶出条件としては、 $\text{pH}$  6～9、塩濃度 0.1～2 M 程度が挙げられる。また、0.1～2 mM 程度のカルシウム塩を添加してもよい。具体的には、0.1～1 M の塩化ナトリウム、1 mM 塩化カルシウム、25 w/v % グリセロール、0.5 w/v % CHAPS を含む 25 mM トリス-塩酸緩衝液（ $\text{pH}$  7.5）等が例示される。また、溶出に際しては、塩濃度をステップワイズに上げる方法、連続的に上げる方法（濃度勾配法）のいずれで行ってもよい。

#### 濃縮（限外濾過）

陰イオン交換体処理後に PON 含有溶液を、分画分子量 10～30 kDa 程度の限外濾過膜を用いて濃縮することができる。

#### 固定化コンカナバリン A（ConA）処理

固定化 ConA は不溶性担体に ConA を結合したものである。不溶性担体としてはアガロース（商品名セファロースなど）、架橋デキストラン（商品名セファデックスなど）、親水性ビニルポリマー（商品名トヨパールなど）等が例示される。不溶性担体に ConA を結合する方法は公知の方法に準じて行うことができる。また市販品を入手することもできる。

固定化 ConA 処理の方法としては、具体的には、PON 含有溶液を固定化 ConA に接触させて PON を固定化 ConA に吸着させた後に、高塩濃度または特定の溶媒を用いて PON を溶出することにより回収する。吸着条件としては、 $\text{pH}$  6～9 程度、塩濃度は 0.1～0.5 M 程度が挙げられる。また、1～20 mM 程度のカルシウム塩、1～10  $\mu$ M 程度の EDTA 塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ土壌金属塩等）

を添加してもよい。具体的には、10 mM塩化カルシウム、0.2 M塩化ナトリウム、5  $\mu$ M EDTA 3ナトリウム塩、25 w/v %グリセロール、0.5 w/v %CHAPSを含む25 mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)等が例示される。吸着後に洗浄を行う場合は、吸着と同様の条件により行うことができる。

また溶出条件としては、pH 6~9、塩濃度1~5 M程度が挙げられる。あるいは、pH、塩濃度は吸着条件のままで、0.1~0.5 M程度の $\alpha$ -メチルマンノシドを用いる。また、1~20 mM程度のカルシウム塩、1~10  $\mu$ M程度のEDTA塩(例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ土壌金属塩等)を添加してもよい。具体的には、10 mM塩化カルシウム、1~4 M塩化ナトリウム、5  $\mu$ M EDTA 3ナトリウム塩、25 w/v %グリセロール、0.5 w/v %CHAPSを含む25 mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)あるいは0.1~0.5 M  $\alpha$ -メチルマンノシド、10 mM塩化カルシウム、0.2 M塩化ナトリウム、5  $\mu$ M EDTA 3ナトリウム塩、25 w/v %グリセロール、0.5 w/v %CHAPSを含む25 mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)等が例示される。また、溶出に際しては、塩濃度あるいは $\alpha$ -メチルマンノシド濃度をステップワイズに上げる方法、連続的に上げる方法(濃度勾配法)のいずれで行ってもよい。固定化ConA処理は必要に応じて行えばよく、また場合により省略することもできる。

陰イオン交換体処理(2回目)

最初の陰イオン交換体処理に準じて繰り返すことができる。

さらにPONの精製度を上げるために公知の手法としてブルーアガロース処理を併用することもできる。その処理条件は公知の方法に準じて行うことができる。ただし、上述のとおり、ポリオールおよびCHAPSの共存下に行う。

本発明の精製法として具体的には以下の方法が例示される。

疎水性担体処理→陰イオン交換体処理→固定化ConA処理→陰イオン交換体処理(2回目)

疎水性担体処理→陰イオン交換体処理→陰イオン交換体処理(2回目)

本精製法により、100~2000 U/A<sub>280</sub>、好ましくは500~1800 U/A<sub>280</sub>程度に高度精製されたPONを調製することができる。なおPON活性の1 Uとは1分間当たり1 nmolのパラオキシノンから同モル量の4-アミノフェノールを生成できることを意味する。詳細は参考例1を参照のこと。

製剤化

精製されたPONを用いて製剤化を行う。精製されたPONとしては上記の精製法により調製されたものを用いることができる。また、公知の精製法により調製されたものを用いてもよい。例えば、ブルーアガロース処理と陰イオン交換体処理を組合せた態様(特許文献1、非特許文献3、同4)などが例示される。

本製剤におけるPONの濃度としては1~100 mg/mL(1800~180000 U/mL)程度が例示される。pHとしては6~9程度、塩濃度としては1~100 mM程度が例示される。添加剤としては、ポリオール、CHAPSが挙げられる。ポリオールとしてはグリセロールなどが例示される。その添加濃度としては、ポリオールが1~5 w/v %程度、CHAPSが0.001~0.1 w/v %程度、が例示される。さらに、塩化カルシウムなどのカルシウム塩、EDTAなどのキレート化剤、トリスなどの緩衝液を用いてもよい。その添加濃度として、カルシウム塩が0.01~1 mM程度、キレート化剤が0.1~1  $\mu$ M程度、緩衝液が1~10 mM程度、が各々例示される。

PON含有溶液に必要なに応じて各種添加剤を添加し、濾過滅菌、小分け分注、凍結乾燥などの方法を用いて製剤化することができる。

用法用量

PONは公知の医薬用途に用いることができる。例えば、解毒剤、動脈硬化への適用などである。また新規な医薬用途としては虚血再灌流に伴う障害および/または脳梗塞の予防治療用等に適用可能である。投与方法としては経口投与・非経口投与のいずれでもよい。非経口投与の場合は静脈内投与などの注射などの態様が挙げられる。その投与量は患者の症状、性別、年齢、体重などに応じて適宜増減すればよい。具体的には0.1~1000



mg/kg 体重程度が例示される。

【実施例】

【0007】

本発明をより詳細に説明するために、以下に実施例および実験例を挙げるが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

参考例 1

A. PON 活性の測定

1) 基質の調製

基質原液 (パラオキシソン、ジエチル p-ニトロフェニルホスフェートのこと、シグマ社) 7  $\mu$ L を 52  $\mu$ L の DMSO で溶解後、0.1 M トリス塩酸、2 mM 塩化カルシウム (pH 8、25  $^{\circ}$ C) で 100 倍希釈した。但し、必要に応じて本測定系には上記の緩衝液にヘパリンを添加 (0.5 mg/mL) した緩衝液を用いた。

2) 測定 (室温で行う)

96 ウエルマイクロプレートに試料 (パラオキシソナーゼを含む) 20  $\mu$ L および、1) で調製した基質溶液 200  $\mu$ L を添加、混和した (パラオキシソンの終濃度は 5 mM となる)。30 分間動力学的モードで波長 405 nm の吸光度を測定し、その結果を Softmax Version 2.35 で計算した。なお試料の希釈には基質調製用と同じ緩衝液を用いた。

3) 活性算出法

2) で得られた  $V_{max} \text{ in mOD/min}$  を用いて以下の式より算出した。但し、当該値は、 $V_{max}$  相関係数が 0.95 以上の値を採用した。

(式 1)

$$\text{PON 活性 (U/mL=nmol/min/mL)} = V_{max \text{ in mOD/min}} / 17000 / 0.6 \times 0.22 \times 1000 \times 50$$

【0008】

B. PON 抗原量はサンドイッチ ELISA 法により測定した。

実施例 1 (精製)

ヒトプール血漿から調製された血清を用いて PON を精製した。ヒト血清を、1 mM 塩化カルシウムを含む生理食塩水で平衡化したフェニルアガロースカラム (フェニルセファロース、アマシャムファルマシア) にアプライした。同溶媒で洗浄した後に、50 w/v % エチレングリコール、1 mM 塩化ナトリウムを含む水溶液で吸着した PON を溶出した。当該溶液を限外濾過膜 (30 kDa) を用いて 1 mM 塩化カルシウム、25 w/v % グルセロール、0.5 w/v % CHAPS を含む 25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で脱塩濃縮し、同溶媒で平衡化した四級アンモニウム型アガロースカラム (Q-セファロース、ファルマシア) にアプライした。同溶媒で洗浄した後に、塩化ナトリウム濃度を、0.1 M  $\rightarrow$  0.15 M  $\rightarrow$  0.2 M  $\rightarrow$  0.25 M  $\rightarrow$  1 M の順にステップワイズに上げて溶出させた。0.2 M + 0.25 M の塩化ナトリウムの溶出画分を回収して、限外濾過膜 (10 kDa) で濃縮した。

実施例 2

実施例 1 で調製された PON 含有溶液を、10 mM 塩化カルシウム、0.2 M 塩化ナトリウム、5  $\mu$ M EDTA 3 ナトリウム、25 w/v % グリセロール、0.5 w/v % CHAPS を含む 25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した ConA アガロースカラム (ConA セファロース、アマシャムファルマシア) にアプライした。同溶媒で洗浄した後に、3 M 塩化ナトリウムを含む同溶媒で PON を溶出した。限外濾過膜 (10 kDa) を用いて濃縮した。当該溶液を実施例 1 の方法に準じて四級アンモニウム型アガロースカラム (前述) を用いて処理し、0.25 M の塩化ナトリウムの溶出画分を回収した。当該四級アンモニウム型アガロース処理 (2 回目) における活性回収率は 95 % であった。また精製 PON を SDS-PAGE (還元条件下) で分析したところ、ほぼ 1 バンド (分子量 45 kDa) として検出された。

実施例 3

四級アンモニウム型アガロース (Q-セファロース) 処理における溶出時の塩化ナトリウム濃度を、0.15M→0.2M→0.25M→1Mの順でステップワイズに上げて行う以外は全て実施例1に準じて行った。0.25Mの塩化ナトリウムの溶出画分を回収して、限外濾過膜 (10kDa) で濃縮した。

#### 実施例4

実施例3で調製されたPON含有溶液を実施例1の方法に準じて再度、四級アンモニウム型アガロースカラムを用いて処理し、0.2Mの塩化ナトリウムの溶出画分を回収した。精製PONをSDS-PAGE (還元条件下) で分析したところ、ほぼ1バンド (分子量45kDa) として検出された。

各実施例で調製されたPONの精製挙動を以下の表に示す。実施例1が表1と2、実施例2が表3、実施例3が表4、実施例4が表5に対応する。

#### 【0009】

【表1】

検体	容量 (mL)	A <sub>280</sub> 回収率 (%)	活性回収率 (%)	比活性 (U/A <sub>280</sub> )
血清	144	100	100	2.14
疎水性担体処理後	250	4.2	66.4	31.93

#### 【0010】

【表2】

検体	容量 (mL)	A <sub>280</sub> 回収率 (%)	活性回収率 (%)	比活性 (U/A <sub>280</sub> )
疎水性担体処理液	10	100	100	32.91
陰イオン交換体処理後 (0.2M塩化ナトリウム 溶出画分)	25	16.8	65.2	126.88
同上 (0.25M塩化ナトリウム 溶出画分)	25	5.9	26.1	139.06

#### 【0011】

【表3】

検体	容量 (mL)	A <sub>280</sub> 回収率 (%)	活性回収率 (%)	比活性 (U/A <sub>280</sub> )
陰イオン交換体処理液	4	100	100	182.7
固定化 ConA 処理後	4.9	7.4	31.4	777.4

#### 【0012】

【表4】

検体	容量 (mL)	A <sub>280</sub> 回収率 (%)	活性回収率 (%)	比活性 (U/A <sub>280</sub> )
疎水性担体処理液	286	100	100	32.41
陰イオン交換体処理後	250	8.6	62.9	266.04

#### 【0013】

【表5】

検体	容量 (mL)	A <sub>280</sub> 回収率 (%)	活性回収率 (%)	比活性 (U/A <sub>280</sub> )
陰イオン交換体処理液	12	100	100	266.04
陰イオン交換体処理 (2回目) 後	25	14.0	57.0	1800.00

#### 【0014】

#### 実施例5 (製剤化)

10mg/mLの精製PON (実施例4により調製)、2.5w/v%グリセロール、0

．05 w/v % CHAPS、0.1 mM 塩化カルシウム、0.5  $\mu$ M EDTA・3 Na を含む 2.5 mM トリスの緩衝液 (pH 7.5) の組成からなる PON 製剤を調製した。

#### 実験例 1 (活性界面剤の安定化効果)

実施例 1 の疎水性担体 (フェニルアガロース、以下の実験例および参考例 2 も全て同様) 処理により得られた溶出液について、各界面活性剤 [ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル (商品名トリトン X-100)、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル (商品名トウイーン 80)、オクチルチオグリコシド、CHAPS] と活性残存率の関係を検討した。溶媒は 1 mM 塩化カルシウム、25 w/v % グリセロールを含む 25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) とした。室温で 30 分間放置後に PON 活性を測定した。結果を表 6 に示す。

【0015】

【表 6】

界面活性剤の種類	界面活性剤の添加濃度 (%)	活性残存率 (%)
直前		100
トリトン X-100	0.1	70
トウイーン 80	0.1	65
オクチルチオグリコシド	0.25	80
CHAPS	0.5	98

【0016】

トリトン X-100、トウイーン 80、オクチルチオグリコシドに比較して、CHAPS の方が高い活性残存率を示し、安定化効果に優れていることが判明した。

#### 参考例 2

疎水性担体処理により得られた溶出液を、1 mM 塩化カルシウム、25 w/v % エチレングリコール、各種界面活性剤 [ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル (商品名トリトン X-100)、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル (商品名トウイーン 80)、オクチルグリコシド] を含む 25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した陰イオン交換体 (DEAE 型アガロース) カラムにアプライし、0.15 M 塩化ナトリウムで溶出した場合の PON の溶出挙動を確認した。トリトン X-100 とトウイーン 80 の添加濃度は 0.1 w/v %、オクチルグリコシドの添加濃度は 0.5 w/v % とした。結果を表 7 に示す。

【0017】

【表 7】

検体		A <sub>280</sub> 回収率 (%)	活性回収率 (%)	比活性 (U/A <sub>280</sub> )
トリトン X-100	疎水性担体処理液	100	100	30.61
	陰イオン交換体処理後	14.6	95.0	149.44
トウイーン 80	疎水性担体処理液	100	100	28.83
	陰イオン交換体処理後	35.6	54.3	121.74
オクチルグリコシド	疎水性担体処理液	100	100	36.08
	陰イオン交換体処理後	30.5	49.6	58.43

【0018】

トウイーン 80 について、精製度 (比活性) はトリトン X-100 と同等になったものの活性回収率は半減した。オクチルグリコシドでは精製度・回収率ともトリトン X-100、トウイーン 80 よりやや劣った。オクチルチオグリコシドを用いた場合、精製度・回収率ともオクチルグリコシドと同等であった (データを示さず)。

#### 実験例 2

疎水性担体処理により得られた溶出液を、1 mM 塩化カルシウム、25 w/v % グリセロール、0.5 w/v % CHAPS を含む 25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡

化した陰イオン交換体（四級アンモニウム型アガロース）カラムにアプライし、0.2～0.25M塩化ナトリウムで溶出した場合のPONの溶出挙動を確認した。結果を表8に示す。

【0019】

【表8】

界面活性剤	A <sub>280</sub> 回収率 (%)	活性回収率 (%)	比活性 (U/A <sub>280</sub> )
疎水性担体処理液	100	100	32.91
0.5% CHAPS	22.7	80	129

【0020】

CHAPSを用いた場合の精製度および活性回収率は参考例2のトリトンX-100とほぼ同等の結果であった。またこの組成物は4℃で1ヶ月間保存しても活性は維持されていた。

実験例3（グリセロール添加効果）

疎水性担体処理により得られた溶出液を、1mM塩化カルシウム、5μM EDTA・3Na、0.5w/v%CHAPS、25w/v%グリセロールを含む25mMトリス塩酸緩衝液（pH7.5）で平衡化した陰イオン交換体（四級アンモニウム型アガロース）カラムにアプライし、0.2～0.25M塩化ナトリウムで溶出した場合のPONの溶出挙動を確認した。対照としてグリセロールを添加しないものを用いた。結果を表9に示す。

【0021】

【表9】

添加剤	A <sub>280</sub> 回収率 (%)	活性回収率 (%)	比活性 (U/A <sub>280</sub> )
疎水性担体処理液	100	100	32.91
CHAPS+グリセロール	22.7	80	129
CHAPS	13.4	64	152

【0022】

グリセロール無添加の場合は、活性回収率はより低い値を示した。またアプライサンプル、得られた画分の安定性についても、1週間保存後で約50%の活性低下が観察された。

実験例4（動物実験）

精製したPONのラット脳梗塞（虚血再灌流）モデルに対する作用を、梗塞巣の体積を指標に評価した。

実験方法

1. 被験物質および調製法

PONは実施例5に準じて10mg/mLの濃度で溶媒に溶解したものを用いた。溶媒は被験物質に用いたもののみを用いた。

2. 動物は、CD(SD)系雄性ラット（体重300g前後、8週齢）を用いた。

3. 評価項目は、梗塞巣の体積とした。

4. 群構成および投与量

対照群は虚血直後に溶媒をラットに尾静脈内投与した（例数は6）。PON投与群は虚血直後に10mg/kg体重をラットに尾静脈内投与した（例数は5）。

5. 方法

虚血再灌流モデルの作製

脳虚血再灌流は、非特許文献7で開示された方法に従い作製した。すなわち、動物をハロタン麻酔下で背位に固定し、頸部を除毛後、頸部皮膚を正中切開した。総頸動脈を周囲組織より剥離し、右外頸動脈及び総頸動脈を絹糸にて結紮して、内頸動脈に糸をかけた後、内頸動脈と外頸動脈の分岐部より、先端約2cmを直径0.45mmにシリコンコーティングした栓子（4-0ナイロン糸、協和時計工業）を18mm挿入し、絹糸にて内頸動脈とともに結紮、固定することにより右中大脳動脈(MCA)灌流領域を虚血にした。切開部を縫合し麻酔より覚醒させた。虚血負荷2時間後に再び切開部を開けて、栓子を約1cm

m引き抜くことにより、右MCA灌流領域の再灌流を行い、再び切開部を縫合した。

#### 梗塞巣体積の測定

再灌流24時間後に動物を断頭し、頭蓋骨の縫合に沿って開頭し、脳組織を摘出して、ブレインスライサー (RBM-4000C、Brain Matrix) を用いて、脳組織をbregmaより前方(+)3mm、1mm及び後方(-)1mm、3mm、5mmで輪切りにして冠状切片を作製した。引き続き2% 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC; ナカライ) を含む0.1Mリン酸緩衝液中で脳切片を約10分間インキュベートした。脳切片を取り出し、水分を軽く除いた後、写真撮影し、TTC染色陽性領域と陰性領域を区別した。これより画像解析装置 (Simple PCI, C-IMAGING systems) を用いて梗塞巣面積を測定し、梗塞巣体積を算出した。

6. 結果を表10に示す。

【0023】

【表10】

	例数	脳梗塞の体積 (mm <sup>2</sup> )
対照群	6	422.5 ± 36.4
PON投与群	5	290.4 ± 42.6*

【0024】

\*は危険率5%未満で有意差が認められることを示す。

PONの投与により、動物実験において虚血再灌流に伴う障害および／または脳梗塞を有意に抑制することが今回、初めて確認された。

【産業上の利用可能性】

【0025】

本発明のPONは解毒剤・動脈硬化への適用などを目的とする医薬品として安定的に臨床の場に供給することができる。さらに、本発明のPONは虚血再灌流に伴う障害および／または脳梗塞の予防治療に有用である。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】パラオキシナーゼ（PON）を臨床適用可能とするための精製および製剤化技術を提供すること；また、PONの新規な医薬用途を提供すること。

【解決手段】PON、ポリオールおよび3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート（CHAPS）を含むPON含有製剤；PON含有溶液を、疎水性担体処理し、次いでポリオールおよびCHAPSの存在下に陰イオン交換体処理することを特徴とするPONの精製方法；PONにポリオールおよびCHAPSを添加することを特徴とするPONの安定化方法；PONを有効成分とする、虚血再灌流に伴う障害および／または脳梗塞の予防治療剤；PON、ポリオールおよびCHAPSを含む、虚血再灌流に伴う障害および／または脳梗塞を予防治療するための薬剤。

【選択図】なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 2 7 7 2 7
受付番号	5 0 4 0 0 1 8 0 0 0 3
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 6 年 2 月 5 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成16年 2月 4日

特願 2 0 0 4 - 0 2 7 7 2 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 6 7 2 5 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市中央区平野町 2 丁目 6 番 9 号

氏 名

三菱ウェルファーマ株式会社